Aus der Universitäts-Frauenklinik Freiburg i. Br.
Direktor: Professor Dr. H. Wimhöfer

Eine neue Erythrozytenzählmethode zur Erfassung der im Laufe der Gravidität oder während des Geburtsverlaufes in den mütterlichen Kreislauf eingeschwemmten, sehr kleinen Mengen fetalen Blutes.

Auszug aus der

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt
von

Gert Alexander Ludwig
aus
Pforzheim

1963

Dekan: Prof. Dr. H. Wimhöfer
Referent: Prof. Dr. H. Wimhöfer

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545301_0036

Sonderdruck
aus „Klinische Wochenschrift", 41. Jahrgang, 11. Heft, 1. Juni 1963, S. 563—565
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg / J. F. Bergmann, München

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Eine neue Zählmethode zur quantitativen Erfassung kleinster Mengen fetaler, in den mütterlichen Kreislauf eingeschwemmter Erythrocyten

Von
J. Schneider und G. A. Ludwig *
Aus der Universitäts-Frauenklinik Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. H. Wimhöfer)

Der quantitative Nachweis des HbF-Anteils in einer Blutprobe war bis vor kurzem in praxi lediglich mit serologischen Methoden[1] oder mittels der Alkalidenaturierung[2, 3] bzw. Säuredenaturierung[4] möglich. Diese Verfahren sind zur Klärung einer Reihe hämatologischer Fragen als Routinemethoden nach wie vor unersetzlich. Die untere Grenze des quantitativen Nachweises von HbF liegt jedoch mit diesen Methoden bei etwa 1% HbF/HbA. Da es sich bei geburtshilflichen Fragestellungen, insbesondere bei der Sensibilisierung einer rh-negativen Mutter durch ein rh-positives Kind, meistens um Einschwemmungen von wenigen mm³ bis ml fetalen Blutes in den mütterlichen Kreislauf handelt[5], haben wir auf Grund von Vorversuchen[5] eine Methode entwickelt, welche die quantitative Bestimmung fetaler in den Erwachsenenorganismus eingeschwemmter Blutmengen im Bereich zwischen 50 mm³ bis 50 ml und darüber erlaubt. Es werden hierzu die HbF-Zellen (fetale Erythrocyten) gegen die HbA-Zellen (Erythrocyten des Erwachsenen) ausgezählt. 1957 gaben Kleihauer und Betke[6] eine Eluierungsmethode für Blutausstriche an, die es ermöglicht, HbF-enthaltende Erythrocyten einwandfrei

* Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit werden von Herrn G. A. Ludwig als Dissertation der Medizinischen Fakultät Freiburg i. Br. vorgelegt.

darzustellen. Hierbei wird das HbA aus den Erwachsenenerythrocyten mittels einer auf p_H 3,2 eingestellten Pufferlösung eluiert, so daß die leeren Erythrocytenhüllen zurückbleiben, während das HbF aus den fetalen Erythrocyten nicht gelöst wird. Derartig behandelte Blutausstriche können nun mit einem von uns angegebenen Zählnetz auch bei Verteilungen von unter 1‰ HbF/HbA-Zellen quantitativ ausgewertet werden.

Anordnung des Zählsystems. In das Okular (8fach) eines Zeiss-Standard-Mikroskopes wird ein Okular-Netz-Mikrometer der Firma Leitz, Wetzlar, eingelegt, dessen Seitenlänge 5 mm beträgt. Es ist darauf zu achten, daß dieses Okularmikrometer mit dem flachen Rand dem Kreuztisch zugewendet liegt. Das

Abb. 1. Es handelt sich um neun in einem Quadrat C angeordnete gleichgroße Quadrate B. Um den äußeren Rand des Gesamtquadrates C sind vier Hilfslinien angeordnet, deren Schnittpunkte mit den verlängerten Seiten c vier kleine Quadrate A entstehen lassen. Diese Quadrate A müssen zuerst aufgesucht und eingestellt werden. Wenn man das Okularmikrometernetz bei 320facher Vergrößerung (Okular 8fach, Objektiv 40fach) durch Veränderung der optischen Tubuslänge genau in ein Quadrat A hineinprojizieren kann, so entspricht die Fläche von Quadrat B genau dem 400fachen Inhalt des auf den Ausstrich projizierten Okularmikrometernetzes und die Fläche C genau dem 3600fachen Inhalt des auf den Ausstrich projizierten Okularmikrometernetzes. Es ist ratsam, die Justierung des Systems nachzukontrollieren: Die Kante des auf den Objektträger projizierten Okularmikrometernetzes muß sich durch Verschieben des Kreuztisches exakt 20mal auf der Kante b nebeneinanderlegen lassen, als Markierungspunkte dienen die Zellen eines untergelegten Ausstrichs. Herstellung: Fa. Fritz Hellige & Co., Freiburg i. Br. (Spezialanfertigung)

Okularmikrometernetz besteht aus 100 Quadraten mit einer Kantenlänge von jeweils 0,5 mm, so daß jedes kleine Quadrat einen Inhalt von 0,25 mm² aufweist. Auf den eluierten und gefärbten Objektträgerausstrich wird nun ein geschliffenes Deckglas aufgelegt, auf dessen Unterseite ein Zählnetz aufgeätzt ist, wie es in folgender Darstellung in etwa zehnfacher Vergrößerung wiedergegeben ist.

Nach der beschriebenen Justierung wird die Zählung folgendermaßen durchgeführt:

Das auf eine möglichst gleichmäßig ausgestrichene Stelle des Objektträgers aufgelegte Deckglaszählnetz wird bei 80facher Vergrößerung (Okular 8fach, Objektiv 10fach) mäanderförmig nach HbF-Zellen durchsucht. Mit einem Quadrat B des Deckglasnetzes lassen sich nun alle Werte ermitteln, bei denen mehr als 10—15 HbF-Zellen in dieses Quadrat fallen. Es werden dabei bei der Auszählung der eluierten Hüllen $4 \times {}^1/_4$ des Okularnetzes auf die Diagonale des Quadrates verteilt und der ausgezählte Wert mit 400 multipliziert. Fallen weniger als 10—15 HbF-Zellen in das Quadrat B, so werden vier Quadrate B durchmustert, viermal das ganze Okularnetz auf die Diagonale der Felder verteilt und der gefundene Wert mit 400 multipliziert. War auch hier die untere Grenze von 10—15 HbF-Zellen erreicht, so wird das ganze Deckglasnetz $C = 9\ B$ auf die Zahl der HbF-Zellen untersucht, das ganze Okularnetz sechsmal auf die Diagonale verteilt und der gefundene Wert mit 600 multipliziert. Unser Vorgehen läßt sich auf einer Tabelle wie folgt darstellen.

Tabelle

HbF-Zellen in Quadrat B	Auszuzählen auf HbF-Zellen	Auszuzählen an Hüllen	Multiplikationsfaktor für Hüllen
Quadrat B 10—15 HbF-Zellen und mehr	$1 \times B$	$4 \times {}^1/_4$ Okularnetz	400
Quadrat B 2—9 HbF-Zellen	$4 \times B$	4×1 Okularnetz	400
Quadrat B weniger als 2 HbF-Zellen	$9 \times B$	6×1 Okularnetz	600

Beispiel

Bei Durchmusterung eines Feldes B finden sich drei HbF-Zellen. Es werden nun vier Felder B abgesucht, was z. B. insgesamt 15 HbF-Zellen ergibt. Nun werden vier vollständige Okularmikrometernetze, welche über die Diagonale der zuvor nach HbF-Zellen abgesuchten Felder B eingestellt werden, voll nach Hüllen abgesucht, wobei die sich in diesem Bereich findenden HbF-Zellen mitgezählt werden. Darauf wird die Summe der aus den vier Okularnetzmikrometerfeldern gezählten HbA-Hüllen mit 400 multipliziert, was z. B. den Wert

$$1875 \times 400 = 750000$$

ergibt.

15 HbF-Zellen : 750000 = 0,02‰ = Promillewert HbF-/HbA-Zellen.

Bei Werten über 1% HbF-Zellen wurden nach Art der Reticulocytenzählung nur zehn Okularmikrometernetze auf einem Ausstrich auf Hüllen und fetale Zellen ausgezählt.

Genauigkeit des Zählsystems

Durch Zumischung von Erwachsenenblut zu Nabelschnurblut haben wir mehrere Reihen von Nabelschnurblutverdünnungen hergestellt, so daß in absteigenden Reihen in den Mischblutproben immer weniger HbF-Zellen enthalten waren. Jeweils eine Verdünnungsreihe umfaßte einen bestimmten prozentualen Bereich, so daß insgesamt alle Bereiche zwischen 10 und 0,001% HbF erfaßt wurden. Von jeder Verdünnungsblutprobe wurden zwei Ausstriche hergestellt, eluiert und der gleichmäßigere zur Auswertung verwendet. Jeder Ausstrich wurde viermal gezählt und daraus die Fehlerbreite σ^2 nach untenstehender Formel (Poisson-Approximation) berechnet.

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum_{1=i}^{n} (x_i - \bar{x})$$

Dabei lag die Fehlerbreite im Durchschnitt bei ± 15%, nie über ± 23,5%. Somit kann die Fehlerbreite der Methode auf maximal ± 25% abgeschätzt werden.

Mit dem von uns entwickelten Zählsystem läßt sich die übergegangene Menge Blut von Kind zu Mutter berechnen, soweit sie größer als 0,05 ml und kleiner als 50 ml ist. Hierzu sollte annäherungsweise

das Blutvolumen der Mutter und die Erythrocytenzahlen/mm³ der Mutter und des Nabelschnurblutes des Kindes bekannt sein.

Zusammenfassung. Das oben angegebene Zählsystem erlaubt es eine feto-materne Transfusion im Bereich von 50 mm³ bis zu 50 ml mit einer maximalen Fehlerbreite von ± 25% quantitativ zu erfassen. Dies entspricht bei einem angenommenen mütterlichen Blutvolumen von etwa 5 Liter Werten von 0,001—1% übergetretenen kindlichen Blutes. Nach Möglichkeit sollten annäherungsweise das Blutvolumen der Mutter und die Erythrocytenzahlen pro mm³ der Mutter und des Nabelschnurblutes des Kindes bekannt sein.

Wir danken Herrn Dipl.-Math. J. GOTTSCHEWSKI, Institut für mathematische Statistik der Universität Freiburg i. Br., an dieser Stelle für seine freundliche Unterstützung.

Literatur. [1] CHOWN, B.: The fetus can bleed. Amer. J. Obstet. Gynec. **70**, 1298—1308 (1955). — [2] BETKE, K., H. R. MARTI and J. SCHLICHT: Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. Nature (Lond.) **184**, 1877 (1959). — [3] KLEIHAUER, E.: Denaturierung von fetalem und bleibendem Hämoglobin des Menschen durch Salzsäure. Naturwissenschaften **10**, 308—309 (1957). — [4] WIMHÖFER, H., J. SCHNEIDER u. F. LEIDENBERGER: Untersuchungen über die Einschwemmung fetaler Erythrozyten in den mütterlichen Kreislauf bei Spontangeburten und geburtshilflichen Eingriffen. Geburtsh. u. Frauenheilk. **22**, 589—597 (1962). — [5] KLEIHAUER, E., H. BRAUN u. K. BETKE: Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstriches. Klin. Wschr. **35**, 637 (1957).

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Lebenslauf

Am 1. Oktober 1937 wurde ich, Gert Alexander Ludwig, als Sohn (3. Kind) des Regierungsmedizinalrates Dr. med. Friedrich Wilhelm Ludwig und seiner Ehefrau Margarete, geb. Kunz zu Pforzheim geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich am 1. September 1948 in das Realgymnasium Pforzheim ein und legte dort am 9. März 1957 die Reifeprüfung ab. Nachdem ich mich entschlossen hatte, Medizin zu studieren, bezog ich im SS 1957 die Ruprecht-Karl-Universität zu Heidelberg. Nach einem Semester an der Universität Hamburg kehrte ich wieder nach Heidelberg zurück. Dort bestand ich am 3. August 1959 die ärztliche Vorprüfung. Im WS 1959/60 und im SS 1960 studierte ich an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt. Seit dem WS 1960/61 war ich an der hiesigen Albert-Ludwigs-Universität immatrikuliert und habe am 16. November 1962 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen dort abgeschlossen.